

Analisis Multidrug Resistensi Terhadap Antibiotik Pada *Salmonella typhi* Dengan Teknik *Multiplex* PCR

ANDI EVI ERVIANI

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin
Jl. Perintis Kemerdekaan, Makassar 90516
email: evierviani@gmail.com

ABSTRACT

This research is about the analysis of resistance multidrug for antibiotic of *Salmonella typhi* with multiplex technique of PCR. This research purpose conducted to determine the presence of resistance multidrug for kloramfenikol and ampicillin of *Salmonella typhi* using multiplex technique of PCR. Testing of resistance multidrug performed using *disc diffusion test* and detection of resistance gene for kloramfenikol (*cat P*) and ampicillin (*tem*) with molecular technique using multiplex of PCR. Result of research indicate the suitability between resistance test using *disc diffusion* and detection resistance gene with multiplex of PCR, which is based on result of *disc diffusion test* and multiplex of PCR have occurred of resistance multidrug for kloramfenikol and ampicillin antibiotics, amount 10 patients (33.3%), resistance of one antibiotics amount 10 patient (33.3%) and non-resistance (*sensitive*) for both antibiotic amount 10 patient (33.3%).

Keywords: Antibiotics, Multidrug, Resistance, *Salmonella typhi*

PENDAHULUAN

Lingkungan di sekitar manusia mengandung berbagai jenis unsur patogen, seperti bakteri, virus, fungi, protozoa dan parasit yang dapat menyebabkan infeksi pada manusia.. *Salmonella typhi* merupakan bakteri patogen yang dapat menimbulkan penyakit demam tifoid pada manusia, yang dapat diekskresikan melalui sekret saluran pencernaan, urine, dan tinja dalam waktu yang bervariasi (Kresno,2001; Lay,1994; Jawetz *et al.*,2001). *S. typhi* masuk ke dalam tubuh manusia melalui makanan atau minuman yang tercemar ke dalam lambung, kelenjar limfoid, usus halus kemudian masuk ke dalam peredaran darah (Kadang, 2000).

Sanitasi, higienitas dan vaksinasi yang dapat menurunkan tingkat insidensi penyakit cenderung masih sulit diterapkan di negara berkembang termasuk Indonesia, sehingga penggunaan antibiotik dinilai sebagai cara yang paling efektif. Antibiotik yang sering digunakan dalam terapi demam tifoid adalah kloramfenikol, ampicilin, kotrimkszol, norfloksasin, neomisin, ciprofloksasin dan pefloksasin (Mirza *et al.*, 2000).

Penggunaan antibiotik diketahui menyebabkan masalah baru yaitu munculnya

resistensi terutama pada pemakaian antibiotik yang tidak prosedural dan tidak terkontrol (Mirza *et al.*, 2000). Resistensi antibiotik pada demam tifoid seringkali dihubungkan dengan meningkatnya morbiditas dan mortalitas yang muncul. Dari beberapa hasil pengujian terhadap resistensi antibiotik membuktikan bahwa telah terjadi resistensi terhadap kloramphenikol, ampicilin, dan sulfonamid.

Teknik PCR dianggap suatu cara yang sederhana, praktis dan cepat untuk memperbanyak sekuen DNA spesifik yang diinginkan dengan ukuran tertentu dengan mekanisme perubahan suhu. Prinsip dasar dari metode ini adalah amplifikasi materi genetik yang terkandung dalam setiap organisme hidup. PCR dapat dilakukan dalam waktu kurang dari satu hari dan jutaan DNA dapat dihasilkan. Dalam penelitian ini, akan dilakukan analisa multidrug resistensi terhadap antibiotik kloramfenikol dan ampicilin pada penderita demam tifoid dengan menggunakan teknik multiplex PCR.

METODE

Kultur dan Identifikasi. Sampel darah dimasukkan ke dalam medium bile broth 1:10 kemudian diinkubasi pada temperatur 35-37°C

selama 24 jam. Koloni yang tumbuh diinokulasi ke medium Salmonella Shigella pada temperatur 37°C selama 24 jam. Pertumbuhan koloni diamati, jika ada dilanjutkan pada TSI agar, diinkubasi 35-37°C selama 18-24 jam. Jika ada pertumbuhan dilanjutkan pada media SM, MR-VP, urea sitrat dan uji gula-gula, masing-masing diinkubasi 35-37°C selama 18-24 jam.

Uji Disc Diffusion. Suspensi bakteri *S. typhi* dari kultur dilakukan pengenceran untuk mengetahui tingkat kekeruhan dengan menggunakan standar kekeruhan *Mc Farland*. Pada kepekaan yang sesuai dengan 0,5 standar *Mc Farland* ditanam pada permukaan agar Mueller Hilton-Agar dengan pH 7,2-7,4 dengan metode sebar. Kemudian paper disc yang mengandung antibiotik kloramfenikol dan antibiotik ampicilin diletakkan di permukaan agar, kemudian diinkubasikan semalam pada suhu 35°C selama 16-18 jam. Zona hambatan yang terbentuk pada agar dan lebar zona tersebut dibandingkan dengan lebar zona hambat standar menurut Oxoid yang mengacu pada kriteria *National Commitee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)* dengan kategori resisten, intermediat dan sensitif. Kategori intermediat untuk kepentingan klinis dimasukkan dalam kategori resisten. Untuk kloramfenikol, kategori resisten ditunjukkan dengan diameter hambatan ≤ 12 mm, intermediat 13-17 mm, dan sensitif ≥ 18 mm. Sedangkan untuk ampicilin, kategori resisten ditunjukkan dengan diameter hambatan ≤ 13 mm, intermediat 14-16 mm, dan sensitif ≥ 17 mm.

Ekstraksi DNA. Sebanyak 900 μ l (buffer lisis) ditambahkan sampel sebanyak 100 μ l atau sedimen sampel yang telah dipekatkan dengan menggunakan sentrifus kecepatan tinggi (12.000 rpm selama 10 menit) dan 40 μ l suspensi diatom ditambahkan ke dalam tabung. Campuran tersebut divortex dan diaduk dengan menggunakan gyrotary shaker dengan kecepatan 100 rpm selama 10 menit. Kemudian divortex kembali dan disentrifus dalam mikrosentrifus ependorf pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 detik. Supernatan dipisahkan dari setiap vial dengan menggunakan pengisap yang terbuat dari pipet

Pasteur plastik tanpa balon udara dan dihubungkan dengan vacuum pump. Pencucian dilakukan sebanyak 2 kali dengan menggunakan 1 ml buffer pencuci L2. 1 ml buffer pencuci L2 ditambahkan ke dalam tabung dan divortex, sentrifus selama 15 detik dan supernatan diisap dengan menggunakan pipet. Pencucian dua kali dengan menggunakan etanol 70 % dan 1 kali dengan 1 ml aseton. Aseton dipisahkan yang terdapat dalam supernatan dengan cara membuka penutup vial dan dipanaskan 56°C dalam water bath atau dengan menggunakan dry block heater. 60 ml TE buffer elusi ditambahkan pada vial. Kemudian divortex secara merata sehingga sedimen dari suspensi tersebut larut. Vial diinkubasi dalam water bath selama 10 menit pada suhu 60 °C. Sentrifus 12.000 rpm selama 30 detik dan diambil secara hati-hati sekitar 40-50 μ l supernatan dan dimasukkan dalam vial yang baru. Buffer TE ditambahkan ulang 80 μ l ke dalam sedimen diatom dan divortex kembali sehingga sedimen akan larut dalam TE buffer elusi. Vial diinkubasi kembali pada water bath selama 10 menit pada suhu 56°- 60°C. sentrifus 12.000 rpm selama 30 detik dan diambil secara hati-hati sekitar 40-50 μ l supernatan dan dimasukkan dalam vial yang sama. Pada akhir prosedur Boom akan didapat sejumlah kecil diatom (sekitar 4 μ l suspensi diatom dalam 100 ml TE buffer elusi). Hasil ekstraksi dapat disimpan pada suhu -20°C atau suhu -80°C.

Proses Amplifikasi pada Mesin PCR untuk Deteksi gen cat P dan Tem F. Amplifikasi PCR untuk pengujian resistensi diperlukan DNA mix untuk satu kali reaksi yang berisi dNTPs 2 μ l, primer TEM Forward (Tem F) dan primer cat P Forward masing-masing 0,1 μ l, 0,2 μ l Taq Polymerase, 10 kali PCR Buffer, dan aquades 17,6 μ l. Campuran reaksi ini dimasukkan dalam tabung 0,5 ml dan ditambahkan 2,5 μ l ekstrak DNA *Salmonella typhi* hasil isolasi, dan 1 tabung diisi dengan 2,5 μ l aquadest steril sebagai kontrol negatif. Amplifikasi dengan menggunakan mesin PCR (DNA Thermal Cycler) sebanyak 40 siklus dengan setiap siklus terdiri dari denaturasi 94°C selama 45 detik, annealing 57°C selama 60 detik, dan polimerisasi 72°C selama 60

detik, setelah selesai 40 siklus kemudian diikuti dengan 72⁰C selama 1 malam. Hasil amplifikasi dapat disimpan pada suhu -80⁰C. Setelah amplifikasi, 8 µl hasil amplifikasi PCR dan 2 µl loading buffer dicampur dan dimasukkan ke dalam sumur gel agarose 2 % yang sudah diberi ethidium bromida. Agar gel direndam pada wadah yang berisi buffer TBE, selanjutnya elektroforesis dijalankan selama 1 jam dengan tegangan konstan 100 volt. Setelah satu jam, elektroforesis dihentikan, gel diangkat untuk diamati di bawah sinar UV. Pada deteksi gen *tem F* (gen resisten terhadap ampicilin), dikatakan hasil positif jika terdapat pita DNA pada fragmen 291 pasangan basa, sedangkan untuk gen *cat P* (gen resisten terhadap kloramfenikol), dikatakan hasil positif jika terdapat pita DNA pada fragmen 436 pasangan basa.

Analisis Data. Data yang diperoleh dari hasil uji kultur, *disc diffusion*, dan multiplex PCR ditabulasi dan dianalisis

HASIL

Uji Resistensi Antibiotik Dengan Metode *Disc Diffusion*. Zona hambat yang terbentuk dari masing-masing disk antibiotik dibandingkan dengan lebar zona hambat standar menurut oxoid yang mengacu pada *National Commitee for Clinical Laboratory Standars* (NCLLS). Hasil pengukuran diameter hambatan dari antibiotik kloramfenikol dan ampicilin dapat dilihat pada tabel 1. Terjadi resistensi terhadap antibiotik kloramfenikol dan ampicilin. Di mana jumlah penderita demam tifoid yang resisten terhadap kedua antibiotik (*Multi Drug Resisten*) sebanyak 10 pasien (33,3%).

Namun ada pula yang resisten hanya terhadap salah satu antibiotik, yaitu 5 pasien (16,67%) yang resisten terhadap antibiotik kloramfenikol tetapi sensitif terhadap antibiotik ampicilin. Ditemukan 5 pasien (16,67%) yang resisten terhadap antibiotik ampicilin, tetapi sensitif terhadap antibiotik kloramfenikol. Ada juga yang sensitif baik terhadap antibiotik kloramfenikol maupun antibiotik ampicilin, yaitu sebanyak 10 pasien (33,3%).

Uji Resistensi Antibiotik Dengan Teknik Multiplex PCR. Pada uji PCR, resistensi terhadap kloramfenikol dideteksi dengan mengamplifikasi gen *cat P*, sedangkan resistensi terhadap ampicilin dideteksi dengan mengamplifikasi gen *tem*. Amplifikasi ini menggunakan primer *forward* untuk gen *cat P* (5'-CC GTT GAT AT ATC CCAA TGG-3'), reverse (5'- CTG GTGA AACT CAC CC AGG G-3'), dan primer *forward* untuk gen *tem* (5'-GC TGATC TCA ACA GCG GTA AG-3'), reverse (5'- C TGA CAA CGA GAG GACC-3') (Haque, *et al.*, 2005).

Pola Resistensi Antibiotik Kloramfenikol dan Ampicilin Pada Penderita Demam Tifoid. Jumlah penderita demam tifoid yang resisten terhadap kloramfenikol berdasarkan uji PCR dan *disc diffusion* adalah 15 orang (50 %) (Tabel 3). Jumlah pasien yang tidak resisten (sensitif) juga 15 orang (50%). Sedangkan untuk antibiotik ampicilin menunjukkan hasil yang sama. Di mana jumlah penderita demam tifoid yang resisten berdasarkan uji PCR dan *Disc diffusion* adalah 15 orang (50%), dan jumlah penderita demam tifoid yang sensitif berjumlah 15 orang (50 %).

Tabel 1. Hasil pengukuran diameter hambatan terhadap antibiotik kloramfenikol dan ampicilin

No	RS	Nama	Umur (tahun)	JK	LD (hari)	Kultur	Diameter zona hambatan (mm)		Kesimpulan
							Kloramfenikol	Ampicilin	
1	WS	MT	26	L	5	POS	24 (S)	25 (S)	S
2	GW	JL	38	P	7	POS	27 (S)	24 (S)	S
3	WS	GH	45	L	3	POS	21 (S)	22 (S)	S
4	DY	LI	12	P	7	POS	23 (S)	26 (S)	S
5	UP	JU	18	L	4	POS	19 (S)	28 (S)	S
6	DY	GA	29	L	5	POS	20 (S)	31 (S)	S

7	KS	YTM	32	P	3	POS	25 (S)	32 (S)	S
8	GW	MK	43	L	4	POS	23 (S)	29 (S)	S
9	KS	WS	31	L	8	POS	22 (S)	24 (S)	S
10	WS	DM	19	P	6	POS	30 (S)	25 (S)	S
11	DY	TK	27	L	6	POS	10 (R)	22 (S)	SR
12	KS	LS	29	P	7	POS	11 (R)	20 (S)	SR
13	DY	DUI	50	P	4	POS	8 (R)	21 (S)	SR
14	KS	FKL	26	L	5	POS	9 (R)	28 (S)	SR
15	WS	FKL	16	L	4	POS	10 (R)	27 (S)	SR
16	WS	HJ	30	P	5	POS	28 (S)	8 (R)	SR
17	KS	UT	54	L	6	POS	24 (S)	8 (R)	SR
18	GW	RI	27	L	3	POS	23 (S)	8 (R)	SR
19	KS	EB	21	P	5	POS	25 (S)	9 (R)	SR
20	DY	GG	28	L	6	POS	27 (S)	10 (R)	SR
21	UP	SY	39	L	3	POS	8 (R)	11 (R)	MDR
22	WS	IW	43	P	5	POS	11 (R)	13 (R)	MDR
23	GW	DW	51	L	4	POS	12 (R)	12 (R)	MDR
24	DY	OB	14	L	3	POS	14 (R)	10 (R)	MDR
25	WS	HH	19	P	4	POS	8 (R)	10 (R)	MDR
26	KS	KW	29	P	7	POS	10 (R)	9 (R)	MDR
27	DY	ART	50	P	6	POS	8 (R)	8 (R)	MDR
28	WS	CG	44	L	3	POS	9 (R)	8 (R)	MDR
29	KS	PIT	34	L	6	POS	12 (R)	13 (R)	MDR
30	GW	JKE	16	L	5	POS	8 (R)	12 (R)	MDR

Keterangan

WS : RS. Wahidin Sudirohusodo

DY : RS. Daya

GW : RS. Sungguhminasa, Gowa

KS : Puskesmas Kassi-Kassi, Makassar

S : Sensitif terhadap antibiotik

R : Resisten terhadap antibiotik

SR : Sensitif resisten (Resisten terhadap salah satu antibiotik)

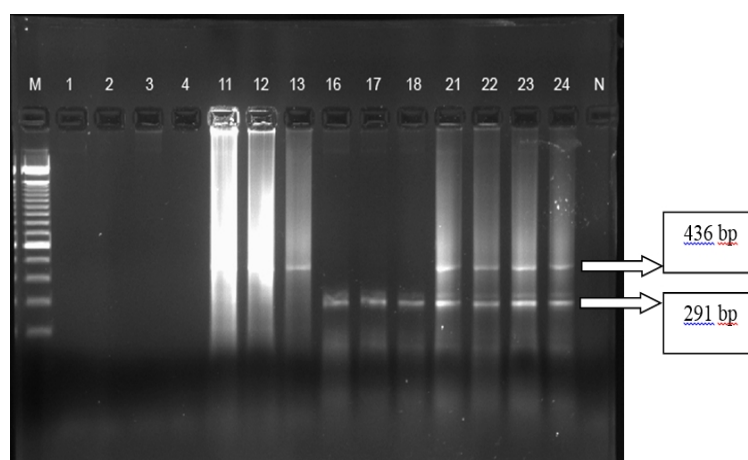
MDR : *Multi Drug Resisten* (Resisten terhadap 2 antibiotik)Tabel 2. Perbandingan hasil uji PCR dan uji *disc diffusion*

No	RS	Nama	JK	Diameter zona hambatan (mm) Uji		Uji PCR		Kesimpulan
				Disc Diffusion				
				Kloramfenikol	Ampisilin	Cat P	Tem F	
1	WS	MT	L	24 (S)	25 (S)	Negatif	Negatif	S
2	GW	JL	P	27 (S)	24 (S)	Negatif	Negatif	S
3	WS	GH	L	21 (S)	22 (S)	Negatif	Negatif	S
4	DY	LI	P	23 (S)	26 (S)	Negatif	Negatif	S
5	UP	JU	L	19 (S)	28 (S)	Negatif	Negatif	S
6	DY	GA	L	20 (S)	31 (S)	Negatif	Negatif	S
7	KS	YTM	P	25 (S)	32 (S)	Negatif	Negatif	S
8	GW	MK	L	23 (S)	29 (S)	Negatif	Negatif	S
9	KS	WS	L	22 (S)	24 (S)	Negatif	Negatif	S
10	WS	DM	P	30 (S)	25 (S)	Negatif	Negatif	S
11	DY	TK	L	10 (R)	22 (S)	Positif	Negatif	SR

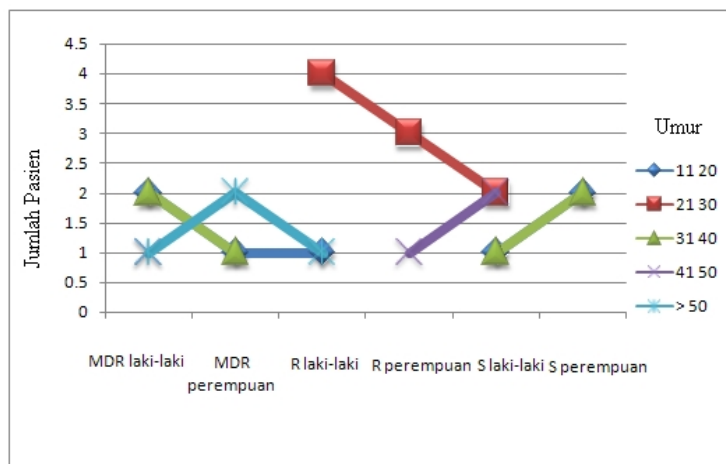
12	KS	LS	P	11 (R)	20 (S)	Positif	Negatif	SR
13	DY	DUI	P	8 (R)	21 (S)	Positif	Negatif	SR
14	KS	FKL	L	9 (R)	28 (S)	Positif	Negatif	SR
15	WS	FKL	L	10 (R)	27 (S)	Positif	Negatif	SR
16	WS	HJ	P	28 (S)	8 (R)	Negatif	Positif	SR
17	KS	UT	L	24 (S)	8 (R)	Negatif	Positif	SR
18	GW	RI	L	23 (S)	8 (R)	Negatif	Positif	SR
19	KS	EB	P	25 (S)	9 (R)	Negatif	Positif	SR
20	DY	GG	L	27 (S)	10 (R)	Negatif	Positif	SR
21	UP	SY	L	8 (R)	11 (R)	Positif	Positif	MDR
22	WS	IW	P	11 (R)	13 (R)	Positif	Positif	MDR
23	GW	DW	L	12 (R)	12 (R)	Positif	Positif	MDR
24	DY	OB	L	14 (R)	10 (R)	Positif	Positif	MDR
25	WS	HH	P	8 (R)	10 (R)	Positif	Positif	MDR
26	KS	KW	P	10 (R)	9 (R)	Positif	Positif	MDR
27	DY	ART	P	8 (R)	8 (R)	Positif	Positif	MDR
28	WS	CG	L	9 (R)	8 (R)	Positif	Positif	MDR
29	KS	PIT	L	12 (R)	13 (R)	Positif	Positif	MDR
30	GW	JKE	L	8 (R)	12 (R)	Positif	Positif	MDR

Tabel 3. Hubungan hasil tes sensitivitas antara metode *disc diffusion* terhadap sampel yang sensitive dan resisten dan teknik PCR

Hasil Uji			<i>Disc diffusion</i>			
			Kloramfenikol		Ampisilin	
			Positif (Resisten)	Negatif (Sensitif)	Positif (Resisten)	Negatif (Sensitif)
PCR	Kloramfenikol	Resisten	15	-	-	-
		Sensitif	-	15	-	-
	Ampisilin	Resisten	-	-	15	-
		Sensitif	-	-	-	15
Total			15	15	15	15



Gambar 1. Comb 1. Sumur 1:marker 100 bp, sumur 2-5: negatif gen cat P dan negatif gen tem F, sumur 6-8: positif gen cat P, sumur 9-11: positif gen tem F, sumur 12-15: positif gen cat P dan gen tem F, sumur 16: kontrol negatif



Gambar 2. Grafik pola resistensi antibiotik berdasarkan jenis kelamin dan kelompok umur

Tabel 4. Persentase penderita demam tifoid pada hasil kultur berdasarkan kelompok umur

Kelompok Umur	Kultur Positif
11 – 20 Tahun	7 (23,3 %)
21 – 30 Tahun	10 (33,3 %)
31 – 40 Tahun	5 (16,7 %)
41 – 50 Tahun	6 (20,0 %)
>50 Tahun	2 (6,7 %)
Jumlah Pasien (Orang)	30 (100,0 %)

Tabel 5. Persentase penderita demam tifoid pada hasil kultur berdasarkan jenis kelamin

Jenis Kelamin	Kultur Positif
Laki-Laki	18 (60,0 %)
Perempuan	12 (40,0 %)
Jumlah Pasien (Orang)	30 (100,0 %)

Tabel 6. Persentase penderita demam tifoid pada hasil kultur berdasarkan lama demam

Lama Demam	Kultur Positif
1 – 6 hari	25 (83,3 %)
7 – 14 hari	5 (16,7 %)
Jumlah Pasien (Orang)	30 (100,0 %)

PEMBAHASAN

Uji Resistensi Antibiotik Dengan Metode *Disc Diffusion* dan Uji PCR. Dalam uji *disc diffusion* maupun dengan uji PCR (tabel 2) ditemukan jumlah penderita demam tifoid yang resisten terhadap kedua antibiotik sebanyak 10 pasien (33,3%). Namun adapula yang resisten hanya terhadap salah satu antibiotik, yaitu 5 pasien (16,67%) yang

resisten terhadap antibiotik kloramfenikol tetapi sensitif terhadap antibiotik ampicilin. Ditemukan 5 pasien (16,67%) yang resisten terhadap antibiotik ampicilin, tetapi sensitif terhadap antibiotik kloramfenikol. Ada juga yang sensitif baik terhadap antibiotik kloramfenikol maupun antibiotik ampicilin, yaitu sebanyak 10 pasien (33,3 %). Sesuai laporan Hadinegoro (1999), para klinisi di

beberapa Negara mengamati adanya kasus demam tifoid yang berat disebabkan oleh strain *S. typhi* yang telah resisten terhadap antibiotik. Sehingga diperlukan pemilihan antibiotik yang tepat dan biaya yang tidak terlalu tinggi.

Metode *disc diffusion* digunakan untuk mengetahui resistensi dan sensitifitas bakteri terhadap penggunaan antibiotik. Kultur dan identifikasi bakteri *S. typhi* selama 4 hari, dilanjutkan dengan uji *disc diffusion*, yaitu suspensi bakteri *S. typhi* dari kultur dilakukan pengenceran kemudian ditanam pada permukaan Mueller Hilton Agar dengan metode sebar, selanjutnya paper disk yang mengandung antibiotik kloramfenikol dan ampicilin diletakkan di permukaan agar, kemudian diinkubasikan semalam (Brooks *et al.*, 2005). Jadi total waktu yang dibutuhkan kurang lebih 1 minggu. Sedangkan metode PCR (multiplex PCR) selain mendeteksi keberadaan *S. typhi* juga bisa langsung mendeteksi adanya resistensi atau *multidrug resistensi* sampai ke tingkat gen dalam waktu kurang dari 10 jam. PCR lebih sensitif (100%) dibandingkan dengan metode *disc diffusion* (Muladno, 2001). PCR dapat digunakan untuk mendeteksi adanya *multidrug resistensi* terhadap ampicilin dan kloramfenikol. Sehingga diketahui adanya *S. typhi* yang resisten terhadap kloramfenikol dan ampicilin karena adanya gen *cat P* dan gen *tem* (gambar 1). Adanya fragmen DNA pada posisi 436 bp menunjukkan bahwa terdapat gen *cat P* termutasi dari *Salmonella typhi* yang resisten terhadap kloramfenikol. Sedangkan adanya fragmen DNA pada posisi 291 bp menunjukkan bahwa terdapat gen *tem* termutasi dari *Salmonella typhi* yang resisten terhadap ampicilin.

Pola Resistensi Antibiotik Pada Penderita Demam Tifoid Berdasarkan Kelompok Umur dan Jenis Kelamin. Berdasarkan jenis kelamin (gambar 2), jumlah pasien yang *multidrug resistensi* lebih banyak ditemukan pada pasien berjenis kelamin laki-laki, yaitu 6 orang (20,0%) dari pada perempuan yaitu 4 orang (13,3%). Jumlah pasien yang resisten terhadap salah satu antibiotik juga ditemukan lebih banyak pada

pasien berjenis kelamin laki-laki yaitu 6 orang (40,0%) dari pada perempuan yaitu 4 orang (13,3%). Jumlah pasien yang sensitif terhadap 2 antibiotik juga ditemukan lebih banyak pada pasien berjenis kelamin laki-laki yaitu 6 orang (40,0%) dari pada perempuan yaitu 4 orang (13,3%). Berdasarkan jenis kelamin, jumlah pasien yang *multidrug resistensi*, resisten, dan sensitif lebih banyak ditemukan pada pasien berjenis kelamin laki-laki. Sedangkan berdasarkan kelompok umur, pasien yang *multidrug resistensi* lebih banyak ditemukan pada kelompok umur antara 11-20 tahun dan 41-50 tahun, yaitu masing-masing 3 orang (10,0%). Jumlah pasien yang resisten terhadap salah satu antibiotik lebih banyak ditemukan pada kelompok umur antara 21-30 tahun yaitu 7 orang (23,3%). Jumlah pasien yang sensitif terhadap 2 antibiotik lebih banyak ditemukan pada kelompok umur antara 11-20 tahun dan 31-40 tahun, yaitu masing-masing 3 orang (10,0%). Hal tersebut sesuai dengan pendapat Kadang (2003), bahwa demam tifoid dapat ditemukan pada semua kelompok umur, dan ditemukan lebih banyak pada laki-laki dibanding perempuan dengan rasio 2-3:1. Namun demikian, menurut B.Senthilkumar *et al.*, (1995), wanita lebih bersifat carier dibandingkan pria dengan rasio 3:1.

Berdasarkan lama demam, penderita demam tifoid lebih banyak dijumpai pada lama demam 1-6 hari atau pada minggu pertama. Hal tersebut berarti hasil positif didapatkan pada minggu pertama berlangsungnya penyakit, yang disebabkan karena minggu pertama merupakan fase bakterimia dan septikimia yang berat. Pada fase tersebut, jumlah bakteri *S. typhi* yang berada dalam darah adalah besar, sehingga persentase kultur darah pada rentang demam di atas dapat mencapai 100 % (Stratford, 1997).

Gejala demam tifoid yang timbul bervariasi. Dalam minggu pertama, gejala dan keluhan serupa dengan penyakit infeksi akut pada umumnya. Yaitu, demam, nyeri kepala, pusing, nyeri otot, anoreksia, mual, muntah, obstipasi atau diare, perasaan tidak enak di perut, batuk dan epistaksis. Pada pemeriksaan fisik hanya didapatkan peningkatan suhu badan. Dalam minggu kedua, gejala-gejala

menjadi lebih jelas. Berupa demam, bradikardi relatif, lidah tifoid (kotor di tengah, tepi dan ujung merah), hepatomegali, splenomegali, meteorismus, gangguan kesadaran berupa samnolen sampai koma (Mansjoer, dkk., 2001).

Dalam pengujian metode kultur, dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor. Diantaranya, penggunaan antibiotik oleh penderita sebelum pemeriksaan, kurangnya volume darah yang digunakan untuk kultur, karakteristik intraselular *S. typhi* dan jenis media yang digunakan untuk kultur (Haque, *et al.*, 1999).

Multi Drug Resistensi (MDR) *Salmonella typhi* Terhadap Antibiotik Ampisilin dan Kloramfenikol. Dari hasil pengujian terhadap resistensi antibiotik, baik menggunakan uji *disc diffusion* maupun uji PCR menunjukkan bahwa telah terjadi *multidrug resistensi* terhadap antibiotik ampicilin dan kloramfenikol. Diketahui, dalam berbagai pengobatan terhadap penyakit, ampicilin paling sering digunakan. Resistensi terhadap ampicilin sebagai salah satu antibiotik yang termasuk dalam golongan penisilin ditentukan oleh produksi enzim perusak cincin penisilin yang dihasilkan organisme (β -laktamase). Beta laktamase membuka cincin β -laktam penisilin dan sefalosporin β -laktam dan meniadakan aktivitas antimikrobiana. Ada satu kelompok β -laktamase yang kadang-kadang ditemukan dalam spesies gram negatif misalnya *Klebsiella pneumoniae* dan *E. coli*. Enzim tersebut dikenal dengan *Extended Spectrum β -laktamase* (ESBL), yang mempunyai kemampuan tambahan kepada bakteri untuk menghidrolisa cincin β -laktam sefotaksim, seftasidim atau astreonam (Jawetz *et al.*, 2001).

Di samping bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan *E.coli* yang menghasilkan enzim ini, di beberapa negara telah dilaporkan juga bahwa bakteri gram negatif termasuk *Enterobacter*, *Salmonella*, *Proteus*, *Citrobacter* spp, *Morganella morganii*, *Shigella dysenterica* dan *Pseudomonas aeruginosa* menghasilkan ESBL. Pada *Salmonella* ditemukan beberapa macam ESBL yaitu enzim *tem*, *sulphydryl* variabel (SHV),

PER, oxacilin OXA dan CTX-M (Kruger *et al.*, 2004). Modifikasi biokimia antibiotik oleh enzim bakteri merupakan suatu masalah yang sangat serius dalam pengobatan antibiotik dan kemoterapi. Jawetz *et al.*, (2001) menyebutkan bahwa semua obat β -laktam menghambat sintesis dinding sel bakteri dan oleh karena itu, aktif melawan pertumbuhan bakteri. Langkah awal dari aksi obat berupa ikatan obat pada reseptor sel. Setelah obat β -laktam melekat pada satu atau beberapa reseptor, reaksi transpeptidase dihambat dan sintesis peptidoglikan dihentikan. Langkah selanjutnya meliputi perpindahan atau inaktivasi inhibitor enzim otolitik pada dinding sel. Aktivasi enzim litik ini menimbulkan lisis jika lingkungan isotonik.

Ada dua tipe mekanisme resistensi untuk golongan penisilin. Satu mekanisme karena ketiadaan beberapa reseptor penisilin dan terjadi sebagai hasil mutasi kromosom. Kedua adalah kegagalan obat β -laktamase untuk mengaktivasi enzim otolitik pada dinding sel. Sebagai hasilnya, organisme dihambat tapi tidak dibunuh. Sifat toleransi ini telah diamati secara khusus pada *Stafilokokus* dan *Streptokokus* tertentu. Kloramfenikol sebagai antibiotik yang juga digunakan dalam penelitian ini, merupakan penghambat yang kuat terhadap sintesis protein pada mikroorganisme. Obat tersebut memblokir ikatan asam amino pada rantai peptida yang mulai timbul pada unit 50S ribosom dengan mengganggu kerja *peptidyl transferase*. Kloramfenikol bersifat bakteriostatik dan bakteri dapat tumbuh kembali jika pengaruh obat dihilangkan. Mikroorganisme resisten terhadap kloramfenikol karena menghasilkan enzim *kloramfenikol acetyltransferase* yang merusak aktivitas obat. Produksi enzim ini biasanya berada di bawah kontrol plasmid. (Jawetz *et al.*, 2001).

Setelah kloramfenikol bertahan sekitar 25 tahun, dilaporkan oleh beberapa peneliti di berbagai negara adanya *strain Salmonella typhi* yang resisten terhadap kloramfenikol. Peneliti India melaporkan adanya kasus demam tifoid yang resisten terhadap kloramfenikol pada tahun 1970, sedangkan di Mexico pertama kali dilaporkan pada tahun

1972 (Hadinegoro, 1999). Resistensi tersebut ternyata diikuti oleh adanya resistensi *Salmonella typhi* terhadap obat-obat lain yang biasa dipergunakan untuk mengobati demam tifoid. Pada bulan Juni 1988, dilaporkan bahwa telah terjadi resistensi terhadap kloramfenikol, ampicilin, trimethoprim, sulfamethoxazole di Mesir (Mikhail *et al.*, 1989). Di negara berkembang, antibiotik yang tersedia untuk pengobatan demam tifoid adalah ampicilin, kloramfenikol, dan kotrimoksazol. Olarte dan Galindo melaporkan pertama kali adanya *strain Salmonella typhi* yang resisten terhadap ampicilin dan kloramfenikol di Mexico tahun 1973 (Hadinegoro, 1999).

Pada saat itu kotrimoksazol baru ditemukan sebagai pengganti kloramfenikol untuk mengobati demam tifoid meskipun kotrimoksazol cepat menjadi resisten. Pada perkembangan resistensi *Salmonella typhi* selanjutnya, beberapa negara melaporkan adanya *strain Salmonella typhi* yang telah resisten terhadap dua atau lebih golongan antibiotik utama untuk pengobatan demam tifoid yaitu kloramfenikol, ampicilin, amoksisilin, dan kotrimoksazol (*multi-drug resistant* = *MDR Salmonella typhi*) (Bhutta *et al.*, 1994; Bhutta, 1997; Mirza, 1995; Memon *et al.*, 1998). Pada tahun 1984 di Thailand dilaporkan adanya MDR pada demam tifoid anak, selanjutnya diikuti oleh negara lain (Mirza, 1995).

Terdapat 4 jalur mekanisme resistensi antibiotik, yaitu penurunan permeabilitas terhadap antibiotik, adanya proses enzimatis, modifikasi letak reseptor obat, dan peningkatan sintesis metabolit antagonis terhadap antibiotik.

Sampai saat ini baru diketahui empat faktor tersebut di atas yang dapat memutuskan kerja antibiotik, yang selanjutnya dapat menyebabkan resistensi masih terdapat faktor fisiologi dari mikroorganisme, tetapi hanya sedikit berpengaruh yaitu replikasi genetik sel (*transcription, translocation*) (Corcoran *et al.*, 1992).

KESIMPULAN

1. Teknik *Multiplex PCR* secara umum mampu mendeteksi adanya *multidrug*

resistensi pada penderita demam tifoid dengan menggunakan primer spesifik gen *cat P* pada bands 436 bps terhadap kloramfenikol, dan primer spesifik gen *tem* pada bands 291 bps untuk deteksi resistensi terhadap ampicilin.

2. Terdapat *Salmonella typhi* yang *multidrug resistensi* terhadap antibiotik kloramfenikol dan ampicilin, sebanyak 10 sampel (33,3 %). Resistensi terhadap antibiotik kloramfenikol tetapi sensitif terhadap ampicilin sebanyak 5 sampel (16,67 %). Resistensi terhadap antibiotik ampicilin tetapi sensitif terhadap kloramfenikol sebanyak 5 sampel (16,67 %). Tidak resisten (sensitif) terhadap kedua antibiotik sebanyak 10 sampel (33,3%). Hal ini berdasarkan hasil dari dua uji, yaitu *disc diffusion* dan *multiplex PCR*.
3. Berdasarkan jenis kelamin, jumlah pasien yang *multidrug resistensi*, resisten, dan sensitif lebih banyak ditemukan pada pasien berjenis kelamin laki-laki dari pada perempuan.
4. Berdasarkan hasil kedua uji yang dilakukan menunjukkan diperolehnya sensitivitas dan spesifisitas yang sama terhadap antibiotik kloramfenikol dan ampicilin pada sampel darah.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai resistensi antibiotik terhadap *S. typhi*, khususnya tentang *Multi Drug Resistensi* (MDR). Sedangkan untuk diagnostik resisten kloramfenikol dan ampicilin disarankan menggunakan teknik *multiplex PCR* agar tindakan pengobatan pada penderita demam tifoid cepat dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Bhutta ZA, Khan IA dan Molla AM. 1994. Therapy of multidrug-resistant typhoid fever with oral cefixime vs. intravenous ceftriaxone. *Pediatr Infect Dis J.* vol 13: 990-994.
- Bhutta ZA. 1997. MDR Typhoid: a potential algorithmic approach to diagnosis and management. Makalah disajikan pada Third Asia-Pacific Symposium on Typhoid Fever and Other Salmonellosis, Bali, 11 Desember.

- Brooks GF, Butel SJ, Morse, Stephan A. 2005. Mikrobiologi Kedokteran. Penerjemah dan Editor, Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Salemba. Jakarta: Medika.
- Hadinegoro SR. 2007. Masalah Multi Drug Resistance pada Demam Tifoid Anak. www.kalbe.co.id. Diakses 3 Juli 2007.
- Haque A, Abdul H, Yasra S, Aamir A, Saira B, Ayesha T, and Mushkoor M. 2005. Identification of Drug Resistance Genes in Clinical Isolates of *Salmonella typhi* for Development of Diagnostic Multiplex PCR. *Pak. Med. SCI.J.* vol 21 (4), 402-407.
- Jawetz ZE, Joseph MEAA, Delberg. 2001. Mikrobiologi Kedokteran. Terjemahan oleh Eddy Mudihardi, dkk. Bagian Mikrobiologi Fak. Kedokteran Universitas Airlangga. Jakarta: Salemba Medika.
- Kadang KJ. 2000. Pengenalan Dini Demam Tifoid. Makalah Temu Muka dan Konsultasi Metode Tepat Mengatasi Demam untuk Pengenalan Dini Demam Berdarah dan Tifoid. Bekasi: Klinik Anakku.
- Kresno BS. 2001. Immunologi: Diagnosis dan Prosedur laboratorium Edisi IV. Jakarta: Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.
- Lay BW. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.
- Mansjoer A, Triyanti K, Savitri R., Wardhani WI, Setiowulan W. 2001. Kapita Selekta Kedokteran. Jakarta: Media Aesculapius Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Memon IA, Billoo AG, and Memon HI. 1998. Cefixime: An oral option for the treatment of multidrug-resistant enteric fever in children. *South Med J.* vol 90: 1204-7
- Mirza SH. 1995. The Prevalence and Clinical Features of Multi-Drug Resistant *Salmonella typhi* Infections in Baluchistan, Pakistan. *Ann Trop Med and Parasitol.* vol 1 (89): 513-519.
- Mirza S, Kariuki S, Mamun KZ, Beeching NJ, and Hart CA. 2000. Analisis of Plasmid and Chromosomal DNA of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhi from Asia. *Journal of Clinical Microbiology.* vol 38 (4): 1449-1452.
- Muladno. 2001. Dasar-Dasar Teknik DNA dan Beberapa Aplikasinya. Bogor: Balai Penelitian dan Pengembangan Zoologi, Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi LIPI.
- Myrvik QN, Russel S, dan Weiser. 1998. Fundamental of Medical Bacteriology and Mycology. Philadelphia: Lea and Febiger.
- Naim R. 2002. Cara Kerja dan Mekanisme Resistensi Antibiotik. Harian Kompas. Diakses 20 februari 2008.
- Olarte J and Emma G. 1973. *Salmonella typhi* Resistant to Chloramphenicol, Ampicillin, and Other Antimicrobial Agents: Strain Isolated during an Extensive Typhoid Fever Epidemic in Mexico. *Antimicrob. Agents Chemotherapy J.* vol 4: 597-601.
- Parkhill J and Dougan G. 1989. Complete Genom Sequence of a Multiple Drug Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhi CT 18. Cambridge: Cambridge University Press.
- Shanahan MA, Philippa, Mary VJ, Christopher JT and Sabastian GB. 1998. Molecular Analysis of and Identification of Antibiotic Resistance Genes in Clinical Isolates of *Salmonella typhi* from India. *Clinical Microbiology J.* vol 36(6): 1595.